

• 综述 •

干细胞归巢与缺血心肌组织

高 波(综述),李忠诚(审校)

(天津市天和医院心内科,天津 300050)

【关键词】 干细胞;缺血;心肌组织

中图分类号:R256.2 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2010.03.030

由于缺血,特别是急性心肌梗死(AMI)造成的不可逆心肌坏死,导致心肌瘢痕形成,非缺血心肌的进行性心室重构,进一步加重心脏功能损伤。当今的治疗手段无法用具有正常功能的心肌细胞替代心肌瘢痕组织,而干细胞的研究进展为我们带来了一线光明。已经确认,在成人个体中仍存在具有自我复制更新和分化潜能的干细胞。目前缺血性心脏疾病,包括心肌梗死的干细胞治疗,无论自身移植还是自身动员,都需要干细胞精确迁移归巢到缺血的心肌组织,才能获得有效的组织再生。对于干细胞归巢的确切机制仍然处于探索之中,已获得的一些结果仍然有待研究证实,有些甚至相互矛盾。本文拟对干细胞归巢机制的研究成果进行综述。

1 用于心肌再生的干细胞种类

1.1 骨骼肌成肌细胞:自体骨骼肌成肌细胞是最早用于心肌再生治疗的干细胞之一^[1],具有对抗缺血以及受损后再生能力^[2],但是骨骼肌成肌细胞不能与存活的心肌细胞形成有效的电耦联同步^[3],因而具有极大的心律失常危险,而且该细胞不能跨越血管内皮迁移到受损区域,冠状动脉(冠脉)注射又有阻塞微循环的危险。

1.2 胚胎干细胞(ESC):ESC是从着床前囊胚的内细胞团或原始生殖细胞中分离出来的,具有全能的分化能力。2001年 Kehat等^[4]将人ESC成功诱导分化成心肌细胞,这些分化的心肌细胞有肌纤维超微结构,免疫组化染色显示肌球蛋白重链(MHC)、 α -肌动蛋白、心肌肌钙蛋白I(cTnI)、结蛋白及心房利钠肽(ANP)阳性,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)提示人心肌cTnI、cTnT、转录因子(GATA-4)、ANP、心房肌球蛋白轻链(MLC-2A)、心室肌球蛋白轻链(MLC-2V)、 α -MHC等特异性基因表

作者简介:高 波(1969-),男(汉族),河北省人,医学硕士,副主任医师。

达,且在微电流的刺激下存在与人心肌细胞类似的电生理现象。已有研究表明,ESC移植可以改善心肌收缩功能,并且仍然具有增殖能力^[5]。但是针对ESC移植的伦理争论、维持移植细胞存活的技术障碍、免疫排斥和肿瘤发生的担忧,仍然是其发展的阻碍。

1.3 骨髓源干细胞(BMSC):BMSC主要包括骨髓造血干细胞(HSC)、骨髓间充质干细胞(MSC)、内皮干/祖细胞(EPC)。早先的研究认为,HSC能分化成心肌细胞,修复受损心肌。其后的基因标记研究显示,BMSC不能横向分化为心肌细胞。迄今,大多数临床研究证实,BMSC可改善心脏功能^[6]。这种改善可能归因于细胞因子和生长因子的旁分泌、血管生成和微循环的改善。成熟个体外周血中,20%的CD34⁺细胞抗原特征为HSC,同时具有血管内皮因子受体。因此,EPC被认为是HSC的一个特殊亚组。EPC可与受损血管融合,形成成熟的内皮细胞,即内皮化、血管新生^[7]。尚未证实EPC能够分化为心肌细胞,但是能促进血管生成,提供旁分泌生存信号。MSC是存在于骨髓中的多能非造血CD34⁻CD45⁻干细胞,能向骨、软骨、脂肪、肌肉、韧带和骨髓基质等同叶细胞分化。Makino等^[8]从鼠股骨中分离MSC,经5-氮杂胞嘧啶核苷处理后,诱导分化出自发跳动、具有心肌细胞形态和机械特征的细胞,细胞通过闰盘相连形成肌管,并出现ANP、脑利钠肽、肌球蛋白、结蛋白、肌动蛋白等心肌胞质特异蛋白的表达。电镜下其超微结构类似心肌细胞,电生理检查发现类窦房结电位和类心室样动作电位。

1.4 心肌干细胞(CSC):一直以来,心肌细胞被认为是终末分化细胞。2001年,Beltrami等^[9]发现,AMI患者梗死心肌边缘区存在具有有丝分裂再生能力的CSC。目前认为CSC是指细胞膜上表达一种或多种干细胞相关抗原,如具有谱

系标记物阴性(Lin⁻)、干细胞因子受体(c-kit⁺)、P-糖蛋白(MDR⁺)和干细胞抗原(Sca-1⁺)等多能干细胞的表面标志,能分化为各种心肌细胞的未分化细胞^[10]。与造血干细胞不同,CSC既不表达CD45也不表达CD34。仅根据多能干细胞表面标志来鉴定CSC,并不能与除HSC外的多能干细胞区别。当采用心脏分化诱导剂缩宫素进行刺激时,CSC表达GATA-4和(或)肌细胞增强因子-2(MEF-2)。但与经5-氮杂胞嘧啶核苷处理的MSC相反,CSC保持CD34⁻,明显提示CSC和MSC是截然不同的^[11]。目前认为大约每30 000~40 000个心肌细胞中就有1个CSC。65%的CSC有c-kit、多药耐药蛋白1(MDR1)、Sca-1样3种干细胞抗原,20%有2种,15%只有1种。Urbanek等^[12]在小鼠成年心脏中发现了干细胞巢,这些干细胞巢位于心肌组织深处,是由细胞和细胞间质共同构成的椭圆形结构,平均每个巢的体积大约是11 000 μm^3 。干细胞巢构成了原始细胞赖以生存、分裂、分化和死亡的微环境,可以避免损伤刺激。心房和心尖部心肌存在更多的干细胞巢,心房巢比心室巢约大2倍。干细胞巢越大,CSC数越多,心房中的CSC数比其他部位的更多。

1.5 其他种类干细胞

1.5.1 心包来源祖细胞(EPDC):EPDC是新近发现的,具有多种分化能力。胚胎期和成体心脏的EPDC至少具有纤维母细胞、内皮细胞和平滑肌细胞分化的能力。有研究显示EPDC可以形成心肌细胞^[13]。

1.5.2 诱导型多能干细胞(iPS):iPS在形态学、基因表达增殖、分化潜能以及肿瘤形成等方面类似ESC。人们通过4个转录因子(Oct-4、Sox-2、Klf和Myc)异位表达的再编码,可以使皮肤成纤维细胞转变为多能干细胞^[14]。

1.5.3 多能成体生殖细胞系干细胞

(maGSC): 近期已从成体大鼠睾丸中分离获得 maGSC, 表明具有 ESC 特性^[15]。maGSC 能分化为类似心室细胞、心房细胞、起搏细胞和浦肯野细胞^[16]。移植的 maGSC 能增殖分化为正常大鼠心肌。

1.5.4 极小胚胎样干细胞 (VSEL): VSEL 存在于骨髓, 极其稀少, 与骨髓单核细胞 (BM-MNC) 相比大约为 $1:10^4 \sim 10^5$ 。VSEL 能表达阶段特异性胚胎抗原、Oct-4、Nanog 和基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 受体 CXCR4^[17]。这些 VSEL 可能存在于发育阶段, 作为循环多能干细胞, 在组织自身平衡中发挥重要作用。

2 干细胞归巢

干细胞归巢涉及微血管内皮的辨认和定位、穿越内皮层、迁移或侵入靶组织等过程的完成, 都依赖于细胞因子、化学因子、黏附分子和细胞外基质金属蛋白酶 (MMP) 等相互间复杂的交互反应。干细胞穿越血管内皮的过程称为渗出。干细胞的渗出滚动阶段是由 P-选择素和 E-选择素介导的。黏附阶段是通过细胞间黏附分子-1/白细胞功能相关抗原-1 (ICAM-1/LFA-1)、血管细胞黏附分子-1/晚脱抗原-4 (VCAM-1/VLA-4) 的配体配对及连接黏附分子 (如血小板内皮细胞黏附分子) 完成的。应用抗体阻断 $\alpha_4\beta_1$ 整合素 (如 VLA-4) 或 VCAM-1, 可使 HSC 归巢减少 90%。整合素介导干细胞和祖细胞的黏附及跨越迁移, 特别是 β_2 整合素在 EPC 归巢血管新生中发挥了重要的作用。

SDF-1 是由血管内皮表达的, 有 SDF-1 α 、SDF-1 β 和 SDF-1 γ 3 种异构体, 干细胞表达其受体 CXCR4, 其表达受到细胞因子和化学因子的动态调控。干细胞归巢时, SDF-1/CXCR4 轴上调。阻断干细胞 CXCR4 或宿主 SDF-1, 可以显著减少干细胞归巢、新生血管形成和组织血流^[18]。大多数细胞因子是通过调节 SDF-1 或其受体 CXCR4, 介导干细胞的迁移。缺血发生时, SDF-1 的表达与缺血组织氧张力的降低成正比^[18], 受损组织释放 SDF-1, 可以刺激 BMSC 动员, 同时吸引干细胞向局部 SDF-1 水平较高的受损组织归巢。SDF-1 能使 ICAM-1/LFA-1 和 VCAM-1/VLA-4 在血流剪切情况下形成稳定黏附, 是调节干细胞归巢的关键因子。其他细胞因子包括粒/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、白细

胞介素-3 (IL-3)、干细胞因子 (SCF) 等, 在归巢过程中, 激活 β_1 整合素 VLA-4 和 VLA-5 可以促进 HSC 黏附。跨越内皮迁移常伴有基质的降解, 可以观察到 MMP 活性的增加。伴有组织损伤炎症发生时, MMP 可以增加 CXCR4 表达及 SDF-1 介导的 HSC 归巢。Malek 等^[19] 研究认为, 炎症因子的释放促进了干细胞归巢迁移种植。目前临床干细胞移植治疗未能获得理想的疗效, 可能与患者特别是终末心脏病患者心脏炎症反应水平较低有关。

很多细胞外刺激通过化学因子受体和受体酪氨酸激酶最终激活肌动蛋白相关蛋白、重组肌动蛋白细胞骨架、激活黏附激酶, 促进干细胞的迁移。新近研究证实, 在 EPC 迁移血管新生过程中, Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK/STAT) 信号途径发挥了重要作用^[20], JAK-2 磷酸化可以显著减少冠心病患者的 EPC。

CSC 数量少, 停留在心脏干细胞巢内, 处于休眠状态, 需要相关因子激活后才能恢复其多能性, 并迁移到损伤部位, 促进心肌再生。迄今为止, 已知的相关因子包括高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 和肌动蛋白结合蛋白胸腺素 4 (T β 4)。HMGB1 是一种染色质结合蛋白, 由坏死细胞被动释放, 可以刺激促炎细胞因子的分泌。HMGB1 对于系膜未成熟细胞、血管平滑肌细胞和纤维母细胞具有趋化作用, 通过细胞骨架重构机制, 促进其迁移和归巢^[21]。HMGB1 被分泌进入细胞间质, 并位于转化细胞的前沿区域, 提示其对于细胞迁移具有重要的作用。HMGB1 受体包括复杂糖化末端产物受体 (RAGE) 以及 Toll 样受体 2 和 4^[22]。Limana 等^[23] 把 HMGB1 注射到左室梗死区周围, 观察到心肌自身 CSC 的增殖分化, 并在左室梗死区内形成新的、但较小的未成熟心肌细胞。T β 4 是惟一确定的成体 EPDC 刺激因子^[24], 是一种肌动蛋白单体隔离蛋白, 通过细胞骨架重构和形成片状伪足, 刺激细胞迁移, 促进心包细胞、平滑肌细胞和内皮细胞的形成。经过 T β 4 处理后, EPDC 增生、迁移、分化成纤维母细胞、平滑肌细胞、内皮细胞和冠状血管的祖细胞。

3 问题与展望

总之, 干细胞治疗是一项正在兴起的

治疗手段, 虽然人们已经踏上了充满希望的旅程, 但是终点仍然遥远。有关干细胞的转化、激活、动员、归巢和分化机制的研究很多还处于推测探索阶段, 早期临床试验也并未取得预期的结果, 我们仍需不断探索以期干细胞治疗能够早日获得成功。

参考文献

- [1] Menasché P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 50(1): 7-17.
- [2] Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*, 2006, 20 (13): 1692-1708.
- [3] Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*, 2005, 23 (7): 845-856.
- [4] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 2001, 108(3): 407-414.
- [5] Kolossov E, Bostani T, Roell W, et al. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med*, 2006, 203(10): 2315-2327.
- [6] Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 2007, 167(10): 989-997.
- [7] Miller-Kasprzak E, Jagodziński PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2007, 55(4): 247-259.
- [8] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 697-705.
- [9] Beltrami AP, Urbaneck K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001, 344 (23): 1750-1757.
- [10] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*, 2005, 85 (4): 1373-1416.
- [11] Davani S, Deschaseaux F, Chalmers D, et al. Can stem cells mend a broken heart? *Cardiovasc Res*, 2005, 65 (2): 305-316.
- [12] Urbaneck K, Cesselli D, Rota M, et al. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(24): 9226-9231.
- [13] Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse

epicardium. *Circ Res*, 2007, 101 (12): 1255-1265.

[14] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126 (4): 663-676.

[15] Guan K, Nayernia K, Maier LS, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440(7088):1199-1203.

[16] Guan K, Wagner S, Unsöld B, et al. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res*, 2007, 100 (11):1615-1625.

[17] Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, et al. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(1):125-134.

[18] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004, 10(8):858-864.

[19] Malek S, Kaplan E, Wang JF, et al. Successful implantation of intravenously administered stem cells correlates with severity of inflammation in murine myocarditis. *Pflugers Arch*, 2006, 452 (3):268-275.

[20] Walter DH, Haendeler J, Reinhold J, et al. Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circ Res*, 2005, 97(11):1142-1151.

[21] Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6):1165-1170.

[22] Bianchi ME, Manfredi A. Chromatin and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1677(1-3):181-186.

[23] Limana F, Germani A, Zacheo A, et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit⁺ cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 2005, 97(8): e73-83.

[24] Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature*, 2007, 445 (7124):177-182.

(收稿日期:2010-02-20)
(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》对计量单位及数字的要求

《中国中西医结合急救杂志》执行 GB 3100~3102-1993《量和单位》中有量、单位和符号的规定及其书写规则,具体写作方法可参照中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》。注意单位名称与单位符号不可混用。组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示,组合单位中斜线和负数幂亦不可混用,例如:ng/kg/min 应采用 $ng \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 的形式,不宜采用 $ng/kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 的形式。在叙述中应首先列出法定计量单位数值,括号内写旧制单位数值;如果同一计量单位反复出现,可在首次出现时注出法定与旧制单位换算系数,然后只列法定计量单位数值。参量及其公差均需附单位,当参量与其公差的单位相同时,单位可只写 1 次,即加圆括号将数值组合,置共同单位符号于全部数值之后。例如:“75.4 ng/L \pm 18.2 ng/L”可以表示为“(75.4 \pm 18.2) ng/L”。量的符号一律用斜体字,如吸光度(旧称光密度)的符号“A”。根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]126 号文件《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡是涉及人体及动物体内的压力测定,可以使用 mm Hg 或 cm H₂O 为计量单位,但首次出现时应注明 mm Hg 或 cm H₂O 与 kPa 的换算系数(1 mm Hg=0.133 kPa,1 cm H₂O=0.098 kPa)。

对于数字的表示,本刊执行 GB/T 15835-1995《出版物上数字用法的规定》。公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量均用阿拉伯数字。百分数的范围和偏差,前一个数字的百分符号不能省略,例如:5%~95%不能写成 5~95%,(50.2 \pm 0.6)%不能写成 50.2 \pm 0.6%。附带尺寸单位的数值相乘,按下列方式书写:4 cm \times 3 cm \times 5 cm,不能写成 4 \times 3 \times 5 cm³。

《中国中西医结合急救杂志》对运用统计学方法的有关要求

- 1 统计学符号:按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
- 2 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。例如:调查设计分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究;实验设计应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等;临床试验设计应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等。主要做法应围绕重复、随机、对照、均衡 4 个基本原则概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
- 3 资料的表达与描述:用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表达近似服从正态分布的定量资料,用中位数(四分位数间距)[$M(Q_R)$]表达呈偏态分布的定量资料。用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚。用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则。用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。
- 4 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析。对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
- 5 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P > 0.05, P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 3 种表达方式,无须再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间。